

dr hab. inż. Ewa Grzebelus  
Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie  
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa  
Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii  
Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa  
al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Chylińskiej**

***pt. Badanie zawartości polisacharydów w ścianie komórkowej owocu pomidora w różnych stadiach jego dojrzałości***

**wykonanej**

**w Zakładzie Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów Instytutu Agrofizyki PAN**

**pod opieką naukową promotora prof. dr hab. Artura Zdunka**

**i promotora pomocniczego dr Moniki Szymańskiej-Chargot**

W przedstawionej do recenzji pracy Autorka podjęła próbę wszechstronnej analizy zmian składu ściany komórkowej, jakie zachodzą w trakcie fizjologicznego dojrzewania owoców, w głównej mierze w kontekście poznania przyczyn mięknięcia owoców, procesu o dużym znaczeniu gospodarczym. Przedmiotem badań był pomidor, obiekt modelowy w badaniach zjawisk związanych z formowaniem i dojrzewaniem owoców. Badania zawarte w pracy doktorskiej Pani mgr Moniki Chylińskiej obejmowały analizę biochemiczną i fizyczną owoców, analizę zawartości polisacharydów ściany komórkowej, analizę widm w podczerwieni (FT-IR) oraz Ramana dla wybranych frakcji pektyn i hemiceluloz oraz analizę przestrzennej lokalizacji polisacharydów z wykorzystaniem mikroskopii ramanowskiej i konfokalnej. Podjęte działania pozwoliły uzyskać kompleksowe informacje nie tylko o składzie ilościowym i jakościowym roślinnej ściany komórkowej, ale także o przestrzennej lokalizacji polisacharydów w analizowanych stadiach dojrzałości owoców oraz wykazały przydatność niedestrukcyjnej techniki obrazowania ramanowskiego w śledzeniu zmian mikrostruktury ścian komórkowych.

**Struktura pracy**

Praca obejmuje 110 stron maszynopisu, jest zorganizowana w sposób typowy dla prac naukowych z zakresu nauk przyrodniczych, ponadto zawiera szczegółowy spis treści, wykaz

skrótów wykorzystanych w tekście, materiały dodatkowe z obrazami Ramana i mikroskopii konfokalnej oraz spis rysunków i tabel.

*Streszczenie* w języku polskim i angielskim bardzo dobrze charakteryzuje założenia pracy i prezentuje najważniejsze obserwacje i wnioski poczynione przez Autorkę.

Krótki *Wstęp* stanowi syntetyczne wprowadzenie w tematykę badawczą podjętą w pracy doktorskiej oraz wskazuje na zasadność przeprowadzonych badań.

*Przegląd literatury* obejmuje 16 stron maszynopisu, jest poprawnie skonstruowany i stanowi syntetyczny opis wiedzy związanej z podjętym przez Autorkę problemem, dobrze wprowadzając w tematykę badawczą realizowaną w pracy doktorskiej. Autorka precyzyjnie omówiła budowę roślinnej ściany komórkowej oraz przedstawiła zmiany w niej zachodzące w czasie dojrzewania owoców. Ostatni podrozdział przeglądu literatury to charakterystyka wybranych (zarówno klasycznych jak i nowatorskich) metod badań składu ściany komórkowej tj. spektroskopii w podczerwieni i Ramana, mikroskopii ramanowskiej oraz immunofluorescencji. W tej części pracy zabrakło mi jednak (tak dla porządku) nawet krótkiego odniesienia do mikroskopii konfokalnej, zastosowanej przez Autorkę do wizualizacji pektyn znakowanych przeciwciałami.

W rozdziale *Cel i zakres pracy* nawiązując do dotychczasowych, czasami sprzecznych informacji odnośnie budowy roślinnej ściany komórkowej Autorka precyzyjnie określiła cel główny i cele szczegółowe swoich badań. Ponadto nakreśliła plan badań (zilustrowany czytelnym schematem proponowanych eksperymentów), w ramach którego założone cele zostały zrealizowane.

Wykorzystane w pracy *Materiały* roślinne zostały precyzyjnie scharakteryzowane, tak aby nie było wątpliwości jakie części owoców i w jakich stadiach dojrzałości były analizowane. *Metody* zostały opisane w sposób szczegółowy i kompletny, dla lepszej czytelności zilustrowane 1. tabelą i 6. rycinami. Należy podkreślić szeroki wachlarz zastosowanych metod o dużym poziomie trudności. Mimo dużej staranności w opisie zauważyłam pewne nieścisłości. Zgodnie ze źródłami na które powołuje się Autorka (Qin i in., 2012 oraz Batu, 2004) szóste (tj. ostatnie) stadium dojrzałości pomidora to *red* a nie *red ripe*. Nie do końca jest również jasne w ilu powtórzeniach biologicznych wykonano poszczególne analizy biochemiczne owoców – w tekście znajduje się tylko informacja o liczbie powtórzeń technicznych w odniesieniu do likopenu. W podrozdziale *Metody statystyczne analizy danych* nie zostało wystarczająco jasno sprecyzowane jakie grupy średnich z analiz chemicznych porównywano w teście RIR – staje się to dopiero oczywiste po przeanalizowaniu tabel 3-4 na str. 54-55. Autorka weryfikowała różnice statystyczne pomiędzy porównywanymi średnimi przy poziomie istotności równym 5% lub 0,05

(jak poprawnie zaznaczono w tab. 3-4), a nie jak podała na str. 52 przy poziomie istotności równym 95%.

*Wyniki i dyskusja* stanowią zasadniczą część pracy i obejmują 31 stron, w tym 3 tabele i 12 złożonych rysunków przedstawiających wybrane polisacharydy ściany komórkowej w postaci widm w podczerwieni, widm Ramana, obrazów Ramana oraz odpowiadające im analizy składowych głównych. Rezultaty badań są przedstawione czytelnie i poparte właściwie dobranym materiałem ilustracyjnym. Drobne niedopatrzenie Autorki to brak skali na obrazach Ramana w rys. 20 (str. 75), brak literowego opisu (A, B, C) dla poszczególnych elementów rysunku 24 oraz błędne odniesienie się do nich w tekście (np. wykresy współrzędnych czynników zmiennych PC2 i PC3 przedstawiono na rysunku 24A, a nie jak Autorka podaje 24B – str. 81). Moje wątpliwości budzi także skala naniesiona na wybranych obrazach mikroskopowych rysunków 25 i 26 – np. w pierwszym rzędzie obrazów rysunku 25 (detekcja z wykorzystaniem przeciwciała LM19) skala jest taka sama, podczas gdy są to wizualizacje uzyskane w różnych powiększeniach (może świadczyć o tym chociażby fakt, że w pierwszej kolumnie obrazów widzimy całe komórki, w drugiej natomiast ich fragmenty). Poszczególne wyniki są prawidłowo skonfrontowane z pracami innych zespołów co sytuuje je w szerszym kontekście. Małym przeoczeniem Autorki jest brak odniesienia do literatury wyników barwienia immunofluorescencyjnego polisacharydów ściany komórkowej.

Rozdział *Wnioski i podsumowanie* to syntetyczne przedstawienie najważniejszych osiągnięć przeprowadzonych badań oraz zbiór sześciu prawidłowo sformułowanych punktów, które w powiązaniu z kluczowymi elementami *Dyskusji*, przedstawiającymi szerszy kontekst pracy, stanowią bardzo rzetelne podsumowanie i podkreślają znaczenie prezentowanych wyników badań. W kontekście treści tego rozdziału, wydaje się, że jego tytuł powinien mieć brzmienie *Podsumowanie i wnioski*.

*Literatura* obejmuje 127 pozycji, w tym 31 publikacji naukowych z ostatnich pięciu lat. Lista referencji jest obszerna, aktualna, dobrze wyselekcjonowana i w pełni pokrywa dyskutowane zagadnienia, tym samym potwierdzając bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Autorki do prowadzenia badań.

Na końcu rozprawy Autorka umieściła *Materiały dodatkowe* w postaci 12. rysunków przedstawiających przestrzenne rozmieszczenie poszczególnych składników ściany komórkowej wygenerowane za pomocą mikroskopii ramanowskiej i konfokalnej. Poszczególne panele są bardzo starannie opracowane graficznie – jednak podobnie jak w przypadku rys. 24-25 mam wątpliwości co do skali naniesionej na wybranych obrazach rysunków D5-D12 (np. rysunek D5, str. 99, pierwszy i trzeci rząd obrazów, skala jest taka sama – powiększenia różne). Ponadto w takich panelach zdjęć jak te zaprezentowane na rysunkach D5-D12 warto opisać co

przedstawiają poszczególne kolumny obrazów np. lewa kolumna – lokalizacja pektyn wyznakowanych przeciwciałem LM19 sprzężonych z Alexa Fluor, środkowa kolumna – wizualizacja ścian komórkowych w kontraście Nomarskiego (jak przypuszczam), prawa kolumna – nałożenie obu obrazów.

### **Merytoryczna ocena pracy**

Dysertacja przygotowana przez Panią Monikę Chylińską dotyczy analizy mikrostruktury ścian komórkowych owoców w trakcie ich dojrzewania. Zmiany jakie wówczas zachodzą w ścianach komórkowych mają bezpośredni wpływ na właściwości mechaniczne tkanek, co między innymi wiąże się ze zjawiskiem mięknięcia owoców decydującym o jakości i wartości handlowej plonu. Uważa się, że właściwości mechaniczne tkanki owoców kształtowane są przez wzajemną adhezję komórek i w głównej mierze zależą od stopnia degradacji pektyn. Do określenia składu jakościowego i ilościowego polisacharydów ściany komórkowej, w tym pektyn, standardowo stosuje się metody biochemiczne lub alternatywnie/uzupełniająco spektroskopię w podczerwieni i Ramana. Natomiast do określenia rozmieszczenia biopolimerów wykorzystywane są stosunkowo czasochłonne i kosztochłonne metody immunocytochemiczne z przeciwciałami do epitopów polisacharydów ściany, znakowanymi fluorescencyjnie. W przedstawionej dysertacji Autorka zastosowała tę metodę jako referencyjną do mapowania ramanowskiego, jednej z najbardziej ostatnio rozwijanych technik spektroskopii Ramana. Dużą zaletą obrazowania ramanowskiego jest tworzenie „chemicznego” obrazu tkanek, których skład i struktura pozostają niezmiennie w stosunku do tkanki natywnej.

W wyniku dobrze zaplanowanych eksperymentów, z wykorzystaniem uzupełniających się technik, Autorka wykazała, że w trakcie dojrzewania owoców obserwuje się relokację pektyn w ścianie komórkowej. W owocach niedojrzałych ich rozmieszczenie jest niejednorodne, z wysoką zawartością w blaszce środkowej na styku sąsiadujących komórek, podczas gdy w owocach dojrzałych ich rozmieszczenie jest homogenne. Sugeruje to związek ze zmieniającymi się w trakcie dojrzewania właściwościami mechanicznymi tkanki owoców. Oprócz niezaprzeczalnego wkładu w badania podstawowe z zakresu mikrostruktury roślinnej ściany komórkowej, za szczególne osiągnięcie tej pracy uważam zastosowanie niedestrukcyjnej techniki jaką jest mikroskopia ramanowska w obrazowaniu kolejnych po barwnikach i karotenoidach roślinnych substancji biologicznych. Wydaje mi się, że opracowana przez Autorkę technika obrazowania ramanowskiego biopolimerów ściany komórkowej może zostać wykorzystana w badaniach odtwarzania ściany komórkowej protoplastów, krytycznego punktu ich redyferencjacji.

Podsumowując zaprezentowana rozprawa dostarcza wielu nowych, wartościowych informacji dotyczących przestrzennej relokacji polisacharydów ściany komórkowej w czasie dojrzewania owoców. Podjęta przez Autorkę tematyka posiada duże znaczenie poznawcze, a w dalszej perspektywie oferuje również potencjalne możliwości aplikacyjne. Należy także podkreślić, że praca była realizowana w ramach projektu badawczego NCN Sonata oraz stażu naukowego Doktorantki w Instytucie Fizyki i Inżynierii Materiałowej na Uniwersytecie Zasobów Naturalnych i Nauk Przyrodniczych w Wiedniu, sfinansowanego przez stronę austriacką. Wskazuje to na umiejętność współpracy Autorki w ramach krajowych jak i zagranicznych zespołów badawczych. Imponujący dorobek publikacyjny Doktorantki, stanowiący, wg bazy *Web of Science*, osiem publikacji w znaczących czasopismach naukowych, w tym jedna obejmująca część wyników zaprezentowanych w niniejszej rozprawie (Chylińska i in., *Plant Methods* 2014, 10:14), pozwala przypuszczać, że pozostałe wyniki przedstawione w dysertacji również zostaną opublikowane w czasopismach o podobnym znaczeniu.

#### **Podsumowanie**

Przedstawioną mi do oceny pracę doktorską Pani mgr Moniki Chylińskiej, pomimo wskazanych powyżej drobnych uwag, oceniam bardzo wysoko. Stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje odpowiednią wiedzę teoretyczną Autorki w dziedzinie nauk rolniczych i dyscyplinie agronomii oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Podsumowując uważam, że złożona dysertacja spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w *Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* oraz w *Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa wyższego z dnia 30 października 2015 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora*. Wnoszę zatem do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Moniki Chylińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 10 sierpnia 2016

  
dr hab. inż. Ewa Grzebelus